

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

15 November 1999 (15.11.99)

International application No.

PCT/JP99/01607

Applicant's or agent's file reference

SN-24/PCT

International filing date (day/month/year)

30 March 1999 (30.03.99)

Priority date (day/month/year)

01 April 1998 (01.04.98)

Applicant

NAGAI, Hiroshi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

29 October 1999 (29.10.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Diana Nissen

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

4T
0500
Translation

0964
1653
7522
5000

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED

FEB 28 2000
TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference SN-24/PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/01607	International filing date (day/month/year) 30 March 1999 (30.03.99)	Priority date (day/month/year) 01 April 1998 (01.04.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/435, 14/745, C12N 1/21, 15/12, A61K 38/36, A01N 63/02		
Applicant SUNTORY LIMITED		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 29 October 1999 (29.10.99)	Date of completion of this report 18 February 2000 (18.02.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01607

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01607

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The inventions described in claims 1 through 16 are not described in any of the documents cited in the ISR, nor would they be obvious to a party skilled in the art from the prior art, which includes these documents.

PCT

国際予備審査報告


(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 03 MAR 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 SN-24/PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/01607	国際出願日 (日.月.年) 30.03.99	優先日 (日.月.年) 01.04.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C07K14/435, 14/745, C12N1/21, 15/12, A61K38/36, A01N63/02		
出願人 (氏名又は名称) サ ン ト リ ー 株 式 会 社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.10.99	国際予備審査報告を作成した日 18.02.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生 	4 N 8 2 1 4
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1 - 16 有
請求の範囲 無

進歩性 (IS)

請求の範囲 1 - 16 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲 1 - 16 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1 - 16 に記載されている発明は、国際調査報告で引用されたいずれの文献にも記載されておらず、かつ、当該技術分野の専門家にとってそれらの文献を含む先行技術からみて自明のものでもない。

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 SN-24/PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/01607	国際出願日 (日.月.年) 30.03.99	優先日 (日.月.年) 01.04.98
出願人(氏名又は名称) サ ン ト リ ー 株 式 会 社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C07K14/435, 14/745, C12N1/21, 15/12, A61K38/36,
A01N63/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C07K14/00-14/825, C12N15/11-15/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A ✓	Toxicon, Volume 33, Number 3, issued March, 1995, Giandomenico Rottini et al., "Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish Carybdea marsupialis", pages 315-326	1-16
A ✓	Toxicon, Volume 26, Number 11, issued 1988, Lucio Cariello et al., "Isolation and partial characterization of rhizolysin, a high molecular weight protein with hemolytic activity, from the jellyfish Rhizostoma pulmo", pages 1057- 1065	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.06.99

国際調査報告の発送日

29.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田俊生

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Biochimica et Biophysica Acta, Volume 667, Number 1, issued 1981, Michael M. Tamkun and David A. Hessinger, "Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-of-War, Physalia physalis", pages 87-98	1 - 16

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協、条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 14/435, 14/745, C12N 1/21, 15/12, A61K 38/36, A01N 63/02	A1	(11) 国際公開番号 WO99/50294 (43) 国際公開日 1999年10月7日(07.10.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01607 (22) 国際出願日 1999年3月30日(30.03.99) (30) 優先権データ 特願平10/88569 ✓ 1998年4月1日(01.04.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530-0004 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 永井宏史(NAGAI, Hiroshi)[JP/JP] 〒618-0001 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-202 Osaka, (JP) 中嶋暉躬(NAKAJIMA, Terumi)[JP/JP] 〒161-0031 東京都新宿区西落合4-6-21 Tokyo, (JP) (74) 代理人 草間 攻(KUSAMA, Osamu) 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル7階 草間特許事務所 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AU, BR, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: NOVEL HEMOLYTIC ACTIVE PROTEINS AND GENES ENCODING THE SAME (54) 発明の名称 新規溶血活性蛋白質および該蛋白質をコードする遺伝子 (57) Abstract Novel proteins having the following characteristics and genes encoding the same by which a novel approach for developing drugs and pesticides with the use or application of hemolytic activity is provided: (1) having a hemolytic activity; (2) having a molecular weight of about 50,000 Da (determined by SDS gel electrophoresis); (3) having an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS: 1 to 3 as a partial amino acid sequence; and (4) having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5 as the full amino acid sequence.		

(57)要約

溶血活性を利用したまたは応用した医薬品開発、農薬開発への新たなアプローチ
を与えるものであり、次の特性：

- ① 溶血活性を有するものであり、
 - ② 分子量が約50,000Da (SDSゲル電気泳動法による)を有し、
 - ③ 部分アミノ酸配列として、配列番号1～3に示すアミノ酸配列を有し、
 - ④ 全アミノ酸配列として、配列番号5で表わされるアミノ酸配列を有する；
- を有する新規な蛋白質、ならびに該蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	DE	ドイツ	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

新規溶血活性蛋白質および該蛋白質をコードする遺伝子

5 技術分野

本発明は、溶血活性を有する蛋白質およびそれをコードする遺伝子に関する。さらに詳細には、本発明は、溶血活性を有する新規蛋白質、その製造方法およびその使用に関する。

10 背景技術

海水浴中におけるクラゲによる刺傷被害は、世界各地で発生しており、我が国でも毎年夏場の海水浴シーズンにアンドンクラゲ (*Carybdea rastoni*) やカツオノエボシ (*Physalia physalis*) による刺傷被害が頻発している。刺傷による症状はクラゲの種類や、患者の個人差により

15 程度が異なるが、その第一は、刺傷部位の疼痛、発赤、丘疹、小水泡などの皮膚症状である。重症例では、出血斑、壊死を起し頭痛、発熱、吐気、呼吸困難、脈拍の変動などの全身症状を伴い死亡することもある。このような被害の多さにもかかわらず、その毒成分を明らかにするとともに、毒成分の薬理学的性質を解明し、クラゲによる刺傷時の治療用薬剤などの開発につなげようとすることはあまり行われていない。

アンドンクラゲの毒成分については、佐藤らによって研究が行われており、アンドンクラゲの触手の凍結乾燥物から調製した粗抽出液中には、溶血、血小板凝集、肥満細胞脱顆粒、血管平滑筋収縮、皮膚壊死、心臓毒性および致死などの活性を示す成分が存在することを明らかにし、その毒成分の血小板凝集作用および

25 血管平滑筋収縮作用について検討がなされている (佐藤昭彦: アンドンクラゲの毒成分の研究、お茶の水医学雑誌, 33巻, 2号, 131-151頁, 昭和60

年6月)。

一方、クラゲ毒の成分としては、その刺胞毒が酸、アルカリ処理、加熱処理、有機溶媒処理、プロテアーゼ処理などで失活し、透析されない高分子物質であることから、その主体は蛋白質であると考えられていた。

- 5 そして、これまでクラゲ由来の蛋白毒の精製も試みられてきたが、クラゲ毒自体は非常に失活しやすいことから、これまではこれらの活性成分について、例えば、その溶血活性を保持したまま単離、精製することは行われておらず、その物理的、化学的な性質も明らかにされていなかった。

- クラゲ毒成分の詳細を解明することは、その蛋白質が有する多種多様な生理活
10 性、なかでも特異的溶血活性、血小板凝集作用を応用した医薬品等の開発のため
に、極めて重要な事項である。したがって、溶血活性を有する蛋白質の構造-活
性相関、種特異性等の研究のために、できるだけ多くの溶血活性を有する蛋白質
またはペプチドを、その生理活性を保持したまま単離し、これらの発生学上また
15 は構造上の類似点を究明する手段を与えるとともに、クラゲによる刺傷被害の治
療に使用することができる医薬品等の開発へのアプローチを与えることが、本発
明が解決しようとする課題である。

発明の開示

- 本発明者らは、アンドンクラゲの刺胞からその溶血活性を指標に、溶血活性を
20 有する蛋白質を、活性を保持したまま単離すべく鋭意研究を行い、活性を保持し
たままの蛋白質を単離、精製する方法を見出すとともに、その部分化学構造が次
のアミノ酸配列式(1)～(3)：

アミノ酸配列式(1)：

- Gly-Glu-Ile-Gln-Thr-Lys-Pro-Asp-Arg-
25 Val-Gly-Gln-Ala-Thr

アミノ酸配列式 (2) :

Gly-Asn-Ala-Glu-His-Val-Ala-Ser-Ala-
Val-Glu-Asn-Ala-Asn-Arg-Val-Asn-Lys

アミノ酸配列式 (3) :

5 Met-Ser-Asp-Gly-Phe-Tyr-Thr-Met-Glu-
Asn-Ser-Asp-Arg-Arg-Lys

(上記の各式中、アミノ酸残基はIUPACおよびIUBの定める3文字表記により表記する)

であり、分子量が約50,000Da (SDSゲル電気泳動法による) である蛋白質であることを明らかにした。そしてさらに、これらの部分化学構造をもとに
10 プライマーを作成し、アンドンクラゲの触手より調製したtotal RNAに対してRT-PCRを行い、約1000塩基対の遺伝子配列を解明し、続いて
5' RACE法、3' RACE法を用いて5' 末端および3' 末端側の遺伝子配列を解明することにより、アンドンクラゲの溶血活性蛋白質の全一次アミノ酸
15 配列および該溶血活性蛋白質をコードする遺伝子配列を決定して、本発明を完成した。

したがって、本発明の一つの態様としては、上記した生理活性および物理的、化学的性質を特性として有し、配列番号5で表わされるアミノ酸配列、またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該アミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1個から複数個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を有する特異的蛋白質を提供し、また別の態様としてかかる蛋白質の製造方法を提供する。さらに別の態様としては、かかる蛋白質をコードする遺伝子、およびこの遺伝子を用いた特異的蛋白質の製造方法、ならびにこの遺伝子を利用した医薬または農薬を提供する。本発明はさらにまた、これらの特性
20 を利用した医薬組成物、特に血小板凝集作用等を有する医薬組成物、または農薬を提供する。また、本溶血活性蛋白質を用いれば、公知の方法 (細胞工学別冊「

抗ペプチド抗体実験プロトコール」：秀潤社）により、特異的抗体を得ることもでき、当該抗体を利用した医薬組成物も提供する。

発明を実施するための最良の形態

- 5 本発明が提供する特異的生理活性を有する蛋白質は、具体的には次のようにして単離、精製することができる。例えば、アンドンクラゲの刺胞をリン酸緩衝液中で超音波処理した後、遠心分離して上清を集め粗抽出物を得る。この粗抽出物をTSK-GEL（東ソー社製）を用いたイオン交換高速液体クロマトグラフィーおよびSuperdex-75（Pharmacia社製）によるゲル濾過高速液体クロマトグラフィーに付して目的とする蛋白質を分離、精製することができる。

- かくして得られた本発明が提供する蛋白質の構造は、酵素を用いた選択的分解によるアミノ酸配列の解析手法、およびPCR法などを用いた遺伝子配列の解析手法を組み合わせることによって決定することができる。例えば、上記によって
- 15 分離、精製した蛋白質をリジルエンドペプチダーゼで処理し、高速液体クロマトグラフィーによりその断片を分取後、アミノ酸シーケンサーなどを用いて分析することによってアミノ酸配列を決定することができる。次に、明らかになったアミノ酸配列をもとにプライマーを作成し、これを用いたRT-PCR法などにより、遺伝子配列を決定することができる。最後に遺伝子配列をもとにアミノ酸
- 20 配列を決定すれば、蛋白質の全一次アミノ酸配列を決定することができる。

かかる分析によって、本発明が提供する蛋白質は、その分子量が約50,000Da（SDSゲル電気泳動法による）であり、その部分アミノ酸配列が上記したアミノ酸配列式（1）～（3）を有するものであることが確認された。

- この部分アミノ酸配列についてホモロジー検索を行った結果、今まで報告されている蛋白質と極めて相同性が低いものであった。したがって、本発明が提供する溶血活性を有する蛋白質は、既知の蛋白質には似ていない全く新しい蛋白質で
- 25

あることが示唆された。

次に、この部分アミノ酸配列をもとにプライマーを作成し、アンドンクラゲの触手より調製した total RNA に対して RT-PCR を行い、約 1000 塩基対の遺伝子配列を解明し、続いて、5' RACE 法、3' RACE 法を用いて 5' 末端および 3' 末端側の遺伝子配列を解明することにより、アンドンクラゲの溶血活性蛋白質は、配列番号 5 で示される全一次アミノ酸配列を有するものであること、および該溶血活性蛋白質をコードする遺伝子は配列番号 4 に示される塩基配列を有するものであることを明らかにした。

さらに、この全一次アミノ酸配列についてもホモロジー検索を行った結果、これまで報告されている蛋白質との相同性は低いものであった。

本発明の特異的蛋白質の分離・精製による製法は、特にその溶血活性を保持したままの状態で行われることを特徴とする。かかる溶血活性を保持したままの分離・精製は、具体的には、上記したリン酸緩衝液による超音波処理、あるいは各種高速液体クロマトグラフィー等の処理を行うに際して、0.1 M 以上、好ましくは 0.3 M 以上、より好ましくは 0.5 M 以上の NaCl 含有の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で、10℃ 以下、好ましくは 5℃ 以下で行うことによって達成される。

したがって、本発明のアンドンクラゲの刺胞からの蛋白質の抽出・精製による製造方法においては、その生理活性を保持したままの製造方法を提供するものでもある。

さらに、本発明の特異的蛋白質は遺伝子組換え法によっても製造することができる。遺伝子組換え法によって製造を行う場合は、常法に従って、例えば配列番号 4 で示される遺伝子を組み込んだベクターを作成し、当該ベクターによって宿主の形質転換を行った後、該宿主を培養または成育させ、該宿主から目的の溶血活性を有する蛋白質を単離、精製して採取すれば良い。

本発明が提供する蛋白質は、溶血活性を有する蛋白質であり、例えば血小板凝

集作用等を有する医薬品としてばかりでなく、溶血に関する研究用の試薬として利用できる。さらにはクラゲによる刺傷時の治療用薬剤など医薬品開発や、溶血活性を利用した殺虫剤等の農業開発への新たなアプローチを与える。

5 実施例

以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

1) アンドンクラゲ刺胞の抽出

- 10 神奈川県三浦海岸で採取し、マイナス80℃で凍結保存されていたアンドンクラゲの刺胞200mgを、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)8ml中に入れ、超音波(井内社製 ultrasonic cleaner VS150)中で15分間処理した後、遠心分離(3,000rpm,20分間)し、その上清を集めた。この操作を計3回行った。さらに、1M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH6.0)8mlにより同様の抽出操作をさらに3回繰り返し、そのすべての上清を集めた。この抽出操作後、直ちに次の精製段階であるイオン交換HPLC(高速液体クロマトグラフィー)を行った。

- 2) イオン交換HPLC(カラム:TSK-GEL CM650S,カラムサイズ:20×220mm)による精製

- 標記カラムを、0.3M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH6.0)にて平衡化した。平衡化後、次いで、上記1)の操作により抽出して得た上清を合わせて、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)で4倍に希釈した後、上記カラムに、流速3ml/分にて供した。サンプルアプライ後、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)100mlで洗浄した。洗浄後、60分間で0Mから0.7MのNaCl濃度によるグラジエント(10mMリン酸緩衝液:pH6.0)にて溶

出を行った。グラジエント開始後、45分から65分の間に多くの溶血活性フラクションが溶出した。なお、溶血活性はヒツジ血球に対する溶血作用で調べた（後記実施例2を参照）。

- 5 3) イオン交換HPLC（カラム：TSK-GEL CM5PW, カラムサイズ：7.5×75mm）による精製

標記カラムを、0.3M NaCl含有10mMリン酸緩衝液（pH6.0）でよく平衡化した。上記2）の精製操作により得られた溶血活性画分を、10mMリン酸緩衝液（pH6.0）で4倍に希釈後、上記カラムに、流速2ml/分
10 にて供した。サンプルアプライ後、10mMリン酸緩衝液（pH6.0）30mlで洗浄した。洗浄後、60分間で0Mから0.8MのNaCl濃度によるグラジエント（10mMリン酸緩衝液：pH6.0）にて溶出を行った。グラジエント開始後、25分から35分の間に多くの溶血活性フラクションが溶出した。分
15 取した溶血活性を有する各フラクションをSDS-PAGEに供し、活性成分の分離具合を確認し、よく分離している部分を集めて次のステップにまわし、分離していない部分については、分離するまで再クロマトグラフィーを繰り返した。

- 4) イオン交換HPLC（カラム：TSK-GEL CM5PW, カラムサイズ：7.5×75mm）による溶血活性成分の濃縮

20 カラムは、0.3M NaCl含有10mMリン酸緩衝液（pH6.0）でよく平衡化した。上記3）の精製操作で得られた溶血活性画分を、10mMリン酸緩衝液（pH6.0）で4倍に希釈後、上記カラムに、流速2ml/分にて供した。サンプルアプライ後、10mMリン酸緩衝液（pH6.0）30mlで洗浄した。洗浄後、0.8M NaCl含有10mMリン酸緩衝液（pH6.0）を
25 流し、カラムに吸着したサンプルを溶出させた。溶媒を交換後5分前後に溶血活性成分が濃縮されて一気に溶出するので、その部分を分取した。

5) ゲル濾過HPLC (カラム: Superdex-75, カラムサイズ: 16 × 600 mm) による精製

イオン交換HPLCによって濃縮されたサンプルを、0.8 M NaCl 含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した上記カラムに 0.5 - 1.0 ml ずつ供し、流速 1 ml / 分で溶出させた。サンプルを注入後、50分から60分の溶出フラクションに強い溶血活性が見出された。SDS-PAGEで分離状況を確認後、活性画分を集め、ここで溶血毒である、本発明の蛋白質が単離された (約1マイクログラム)。

10 実施例2: 溶血活性の測定

上記の実施例1における各精製段階での溶血活性の測定、ならびに最終的に得られた本発明の蛋白質の溶血活性の測定は、以下のようにして行った。

1) 方法

溶血活性は、ヒツジ赤血球に対する溶血により測定した。すなわち、0.8% のヒツジ赤血球を含むPBS (+) 緩衝液を96穴のマイクロウェルプレート (丸底タイプ) に200 µl 溶液ずつ入れ、そこに、上記実施例1の各精製段階で得られた画分を、10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させた溶液10 µl を加え、室温下に3時間放置し、各プレートのヒツジ赤血球の溶血状態を観察した。なお、溶血活性を保持しているか否かは、各精製段階で得られた画分について、完全溶血を示すか、示さないかで判断を行った。

2) 結果

2-1) 上記実施例1の各精製段階で得られた画分は、ヒツジ赤血球に対し、完全溶血を示し、その溶血活性が保持されていることが判明した。

25 2-2) また、上記実施例1の5)の精製操作で最終的に得られた溶血活性を有する本発明の蛋白質については、その100 ng / ml (約2 nM) 以下の濃度

で、ヒツジ赤血球に対して完全溶血を引き起こした。

実施例 3：蛋白質の分子量の決定と部分構造の決定

3-1) 分子量の決定

5 実施例 1 の 5) の精製操作で得られた溶血活性を有する本発明の蛋白質を、常法に従って SDS ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) させたときに現れるシングルバンドと、蛋白質分子量マーカー (Pharmacia 社製) との比較により、本発明の蛋白質は、その分子量が約 50,000 Da の蛋白質であることが確認された。

10

3-2) リジルエンドペプチダーゼによる分解

上記実施例 1 の 5) の精製操作で得られた溶血活性を有する本発明の蛋白質 10 μ g に、Achromobacter Protease I (Achromobacter lyticus M497-1 株由来：宝酒造社製) 3 pM を加え、10 mM のトリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) 中で 30℃ にて 20 時間インキュベートして、蛋白質の分解を行った。この酵素消化された蛋白質を高速液体クロマトグラフィー (カラム：Bakerbond wide pore ODS) に付し、60 分間で 10% から 62% のアセトニトリル濃度によるグラジエント (0.1% トリフロロ酢酸含有水) にて、流速 0.7 ml/分 で分離した。その結果、保持時間 19.23 および 27 分に各々溶出した 3 種類のペプチドフラグメントを得た。

20

3-3) 各フラグメントのアミノ酸シーケンサーによる構造決定

以上のようにして得られた 3 種のペプチドフラグメントについて、Shimadzu PSQ-1 protein sequencer (島津製作所社製) を使用して、常法に従ってそのアミノ酸配列を決定した。

25

その結果、3種のフラグメントは、以下のアミノ酸配列式(1)～(3)を有しているものであることが判明した。

アミノ酸配列式(1)：

Gly-Glu-Ile-Gln-Thr-Lys-Pro-Asp-Arg-
5 Val-Gly-Gln-Ala-Thr

アミノ酸配列式(2)：

Gly-Asn-Ala-Glu-His-Val-Ala-Ser-Ala-
Val-Glu-Asn-Ala-Asn-Arg-Val-Asn-Lys

アミノ酸配列式(3)：

10 Met-Ser-Asp-Gly-Phe-Tyr-Thr-Met-Glu-
Asn-Ser-Asp-Arg-Arg-Lys

(上記の各式中、アミノ酸残基はIUPACおよびIUBの定める3文字表記により表記する)

上記によりアミノ酸配列が決定された各フラグメントについて、ホモロジー検索を行った結果、これらのフラグメントはこれまでに報告されている蛋白質と極めて相同性が低く、したがって、アンドンクラゲの刺胞よりその溶血活性を保持したまま分取した本発明の特異的な蛋白質は、全く新しい蛋白質であることが示唆された。

20 実施例4：蛋白質の全アミノ酸構造およびそれをコードする遺伝子の決定

4-1) アンドンクラゲ total RNAの調製

アンドンクラゲの触手(湿重量約0.5g)を液体窒素中で粉碎し、5mlのTRIzol(登録商標)試薬(GIBCO BRL社製)中でホモジナイズした。1mlのクロロホルムを加えて攪拌後、冷却遠心機(佐久間製作所社製)で
25 遠心分離(13,000rpm、15分間、4℃)した。上層の水層を分取して2.5mlのイソプロパノールを加え、室温で10分静置した。冷却遠心機で

遠心分離 (13,000 rpm、10分間、4℃) した後、上清を除いて5mlの75%エタノールを加え、再度遠心分離 (10,000 rpm、5分間、4℃) した。上清を除いて約10分間風乾し、100 μ lのRNase-free水を加え、60℃で10分間インキュベートしてRNAを溶解した。以上
5の方法で約0.5mgのtotal RNAが得られた。

4-2) 部分cDNAのクローニング

アミノ酸配列式(1)、アミノ酸配列式(2)、アミノ酸配列式(3)を基に、以下の縮重プライマーを設計し、常法により合成した。

10 7-F; GAR ATH CAR ACI AAR CCI G

7-R; CIG GYT TIG TYT GDA TYT C

12-F; GCI GTI GAR AAY GCI AAY MG

12-R; CKR TTI GCR TTY TCI ACI GC

14-1-F; GAY GGI TTY TAY ACI ATG G

15 14-1-R; CCA TIG TRT ARA AIC CRT C

14-2-F; GAY GGI TTY TAY ACI ATG GAR AA

14-2-R; TTY TCC ATI GTR TAR AAI CCR TC

(上記の各式中の英文字は、「ヌクレオチド略語表」による(細胞工学別冊「バイオ実験イラストレイテッド」: 秀潤社))

20 次に、SUPERScript (登録商標) Preamplification System for 1st-Strand cDNA Synthesisを用いて、以下の手順で1本鎖cDNA (1st-strand cDNA) を合成した。すなわち、1 μ gのtotal RNA、oligo(dT)₁₂₋₁₈、DEPC-処理水を混合し、70℃で10分間処理した後、さらに
25 PCR buffer、25mM MgCl₂、10mM dNTP mix、0.1M DTTを加えて42℃で5分間ブレインキュベートした。そこに、

SuperScript II RT (200 units/ μ l) を加えて、さらに42℃で50分間インキュベートし、70℃で15分間処理した。そこに、RNase Hを加えて37℃で20分間インキュベートし、1st-strand cDNAを得た。

- 5 続いて、GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer社製) を用い、以下の条件でPCRを行った。即ち、1st-strand cDNA、PCR buffer、dNTP mix、primer 1、primer 2 (ここで、primer 1、primer 2とは、上記8種類の任意のプライマーである)、TaKaRa
10 a Ex Taq (登録商標-宝酒造社製)、水を混合し、94℃5分間の後、94℃30秒間、45℃30秒間、72℃2分間で3サイクル、さらに、94℃30秒間、55℃30秒間、72℃2分間で27サイクルの後、72℃で5分間反応させた。

- 反応液を0.8%アガロースゲルで電気泳動した結果、7-Fと12-R、7
15 -Fと14-1-R、7-Fと14-2-R、12-Fと14-1-R、12-Fと14-2-Rの組み合わせで、PCR産物の増幅がみられた。各PCR産物のサイズは、順に約600bp、1000bp、1000bp、400bp、400bpであった。

20 4-3) 部分cDNAの塩基配列の決定

- 各PCR産物を、TAクローニングベクターpCR2.1 (Invitrogen社製) に挿入し、組換え体が大腸菌JM109に形質転換してLB (50 μ g/ μ lアンピシリンを含む) 寒天培地上で培養した。得られたコロニーを
25 鋳型に、M13ユニバーサルプライマーを用いて以下の条件でcolony PCRを行った。大腸菌の菌体、PCR buffer、dNTP mix、M13 FW primer、M13 RV primer、TaKaRa Ex

Taq (登録商標—宝酒造社製)、水を混合し、90℃10分間の後、94℃30秒間、55℃30秒間、72℃2分間で30サイクル、72℃でさらに5分間反応させた。反応液を0.8%アガロースゲルで電気泳動後、目的の colony PCR産物をMicroSpin (登録商標) S-400 (Amersham Pharmacia社製) を用いたスピンカラムで精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製) を用いてシーケンシングを行った。

得られた配列を、遺伝子解析ソフトGENETYX-MAC (ソフトウェア開発社製) を用いて解析した結果、約1000bpの部分cDNA配列が解明でき、アミノ酸配列式(1)、アミノ酸配列式(2)およびアミノ酸配列式(3)の各部分構造は、蛋白質のN末端側からこの順番で位置していることが明らかになった。

4-4) 全長cDNAの塩基配列決定

部分cDNAの塩基配列から、以下のプライマーを合成した。

5' -RACE-4R; GCT CTA TCA ATA ACG GCA GC
 5' -RACE-5R; TGT CTT TGG ATG GCC TCA TC
 5' -RACE-6R; GAT ACT TAG GTC GCT ATC CG
 3' -RACE-1F; GTT CAG AGG CTG TTC TAA CG
 3' -RACE-2F; ATG TCT GAC GGC TTC TAC AC
 次に、5' / 3' RACE Kit (Boehringer Mannheim社製) を用いて、以下の手順で5' RACEおよび3' RACEを行った。

(a) 5' RACE

1μgのtotal RNA、cDNA synthesis buffer

r, dNTP mix, 5' -RACE-6R, AMV reverse transcriptase, DEPC-処理水を混合し、55℃で60分間インキュベートの後、65℃で10分間処理して1st-strand cDNAを合成した。

- 5 次いで、1st-strand cDNAをスピンカラムで精製した後、reaction buffer、2mM dATPを加えて94℃で3分間処理した。そこに、terminal transferase (10 units / μ l)を加え、37℃で20分間インキュベート後、1st-strand cDNA、PCR buffer、dNTP mix、5' -RACE-5
- 10 R, oligo (dT) -anchor primer、水を混合し、94℃5分間の後、94℃30秒間、55℃30秒間、72℃1分間で30サイクル、72℃でさらに5分間反応させた。続いて、1st-PCR産物を鋳型にし、5' -RACE-4RとPCR anchor primerの組み合わせで、1st-PCRと同条件でnested-PCRを行った。
- 15 1st-PCR産物、nested-PCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動したところ、約500bpのバンドが確認できた。このnested-PCR産物をTAクローニングベクターに挿入し、上記の4-3)に記載するcDNAの塩基配列の決定に従って、シーケンシングを行い、配列を解析した。

20 (b) 3' RACE

- 1 μ gのtotal RNA、cDNA synthesis buffer、dNTP mix、oligo (dT) -anchor primer、AMV reverse transcriptase、DEPC-処理水を混合し、55℃で60分間インキュベート後、65℃で10分間処理して1st-
- 25 strand cDNAを合成した。

続いて以下の条件で1st-PCRを行った。1st-strand cDN

A、PCR buffer、dNTP mix、3'-RACE-1F、PCR anchor primer、TaKaRa Ex Taq（登録商標-宝酒造社製）、水を混合し、94℃5分間の後、94℃30秒間、55℃30秒間、72℃2分間で30サイクル、72℃でさらに5分間反応させた。続いて、
5 1st-PCR産物を鋳型にし、3'-RACE-2FとPCR anchor primerの組み合わせで、1st-PCRと同条件でnested-PCRを行った。

1st-PCR産物、nested-PCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動したところ、約600bpのバンドが確認できた。このnested-
10 PCR産物をTAクローニングベクターに挿入し、上記の4-3)に記載するcDNAの塩基配列の決定に従って、シーケンシングを行い、配列を解析した。

以上の結果から、アンドンクラゲの新規溶血活性蛋白質をコードするcDNAのサイズ(1610bp)と配列、アミノ酸の数(450aa)と配列が明らかになり、アンドンクラゲの溶血活性蛋白質は、配列番号5で示されるアミノ酸配
15 列を有し、溶血活性蛋白質をコードする遺伝子は配列番号4で示される塩基配列を有するものであった。

アミノ酸配列式(1)(配列番号1)が、配列番号5のアミノ酸番号56から69に、アミノ酸配列式(2)(配列番号2)が、配列番号5のアミノ酸番号250から267に、アミノ酸配列式(3)(配列番号3)が、配列番号5のア
20 ミノ酸番号363から377に対応していた。さらに、配列番号4のヌクレオチド番号1600以降にポリA配列が存在した。

以上のようにして得られた本発明の新規な蛋白質は、上記した実施例に記載のように、その生理活性および物理的、化学的特性として；

- 25 (a) 溶血活性を有するものであり、
(b) 分子量が約50,000Da(SDSゲル電気泳動法による)を有し、

(c) その部分アミノ酸配列として、上記したアミノ酸配列式(1)～(3)を有し、

(d) その全アミノ酸配列として、配列番号5で表わされるアミノ酸配列を有する特異的な蛋白質である。

5

産業上の利用可能性

本発明が提供するアンドンクラゲの刺胞由来の溶血活性を有する蛋白質は、その部分アミノ酸配列および全一次アミノ酸配列からホモロジー検索を行った結果から、既知の蛋白質には似ていない新しい蛋白質であり、例えば溶血のメカニズム等を解明するための生化学試薬として有用である。

10

また、分子レベルでの構造活性相関の研究や、当該蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体の研究などにより、例えばクラゲによる刺傷時の治療用薬剤など医薬品開発への新たなアプローチを与えるものであり、さらに血小板凝集作用等を有する医薬品や、溶血活性を利用した農薬として有用なものでもある。

15

請求の範囲

1. 次の特性：

① 溶血活性を有し；

5 ② 分子量が約50,000Da（SDSゲル電気泳動法による）であり；

③ 部分アミノ酸配列として、配列番号1～3に示すアミノ酸配列を有する；
を有する蛋白質。

10 2. アンドンクラゲ（*Carybdea rastonii*）の刺胞より得られる、請求の範囲第1項に記載の蛋白質。

3. 請求の範囲第1項に記載の溶血活性蛋白質と同一のアミノ酸配列、あるいはそのアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸の付加、欠失、および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有し、遺伝子組
15 換え技術によって造成された形質転換細胞の培養物から得られる溶血活性を有する蛋白質。

4. 配列番号5に示すアミノ酸配列、あるいはそのアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸の付加、欠失、および／または他のアミノ酸による置換に
20 より修飾されたアミノ酸配列を有し、かつ溶血活性を有する蛋白質。

5. 配列番号1～3に示すアミノ酸配列のうち、少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いて、遺伝子組換え
技術によって造成された形質転換細胞の培養液から得られる請求の範囲第3項ま
25 たは第4項に記載の溶血活性を有する蛋白質。

6. アンドンクラゲ (*Carybdea rastonii*) の刺胞をリン酸緩衝液中で超音波処理し、遠心分離したその上清をイオン交換高速液体クロマトグラフィー、およびゲル濾過高速液体クロマトグラフィーにより抽出・精製して採取することからなる、請求の範囲第1項、第2項または第4項に記載の蛋白質の製造方法。

7. 刺胞のリン酸緩衝液中での超音波処理、あるいはイオン交換高速液体クロマトグラフィーおよびゲル濾過高速液体クロマトグラフィー処理を、0.1M以上のNaCl含有の10mMリン酸緩衝液(pH6.0)中で、10℃以下で行うことを特徴とする、請求の範囲第6項に記載の蛋白質の製造方法。

8. 請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の溶血活性を有する蛋白質のアミノ酸配列をコードする遺伝子。

9. 請求の範囲第8項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

10. 請求の範囲第9項に記載のベクターにより形質転換された宿主。

11. 請求の範囲第10項に記載の宿主を培養し、または生育させ、そして該宿主から溶血活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造方法。

12. 請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の蛋白質を有効成分とする医薬組成物。

13. 血小板凝集作用を有するものである請求の範囲第12項に記載の医薬組成

物。

14. 請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の蛋白質またはそれらの部分ペプチドを抗原とする抗体。

5

15. 請求の範囲第14項に記載の抗体を用いた医薬組成物。

16. 請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の蛋白質を有効成分とする農薬。

10

配 列 リ ス ト
SEQUENCE LISTING

<110> SUNTORY LIMITED

<120> New Hemolytic Proteins and Gene Coding Thereof

<130> SN-24_PCT

<150> JP10-88569

<151> 1998-04-01

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> CARYBDEA RASTONII

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<400> 1

Gly Glu Ile Gln Thr Lys Pro Asp Arg Val Gly Gln Ala Thr

1

5

10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> CARYBDEA RASTONII

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(18)

<400> 2

Gly Asn Ala Glu His Val Ala Ser Ala Val Glu Asn Ala Asn Arg Val

1

5

10

15

Asn Lys

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> CARYBDEA RASTONII

<400> 3

Met Ser Asp Gly Phe Tyr Thr Met Glu Asn Ser Asp Arg Arg Lys

1 5 10 15

<210> 4

<211> 1610

<212> DNA

<213> CARYBDEA RASTONII

<220>

<221> protein_bind

<222> (1)..(27)

<220>

<221> CDS

<222> (28)..(1380)

<220>

<221> protein_bind

<222> (1381)..(1610)

<400> 4

gcacaagcga ctgtgtgaag gagcacc atg att ctg aaa cat ctt cct tgg ctc 54

Met Ile Leu Lys His Leu Pro Trp Leu

1 5

ttt att gtc ctt gca att act tct gca aaa cat ggc aaa cgc tct gat 102

Phe Ile Val Leu Ala Ile Thr Ser Ala Lys His Gly Lys Arg Ser Asp

10 15 20 25

gtc aat tct tta ctt act aag gta gaa act gcc tta aaa gaa gct tct 150

Val Asn Ser Leu Leu Thr Lys Val Glu Thr Ala Leu Lys Glu Ala Ser

30 35 40

ggt agc aac gag gct gct ctt gag gct tta gag ggc tta aaa gga gag 198

Gly Ser Asn Glu Ala Ala Leu Glu Ala Leu Glu Gly Leu Lys Gly Glu

```

      45          50          55
atc cag aca aaa cca gac cga gtt gga caa gcc aca aaa atc ctt gga 246
ile Gln Thr Lys Pro Asp Arg Val Gly Gln Ala Thr Lys Ile Leu Gly
      60          65          70
tct gtc gga tca gct cta gga aaa tta aat tct gga gat gca acc aaa 294
Ser Val Gly Ser Ala Leu Gly Lys Leu Asn Ser Gly Asp Ala Thr Lys
      75          80          85
atc att tct ggt tgc ctc gac att gtt gca gga att gca aca act ttt 342
ile ile Ser Gly Cys Leu Asp ile Val Ala Gly ile Ala Thr Thr Phe
      90          95          100          105
gga ggc cct gtc ggg atg gga atc gga gcc gta gct tct ttt gtt tct 390
Gly Gly Pro Val Gly Met Gly ile Gly Ala Val Ala Ser Phe Val Ser
      110          115          120
tca att cta tca ttg ttt act gga agc tca gca aag aac tca gtt gct 438
Ser ile Leu Ser Leu Phe Thr Gly Ser Ser Ala Lys Asn Ser Val Ala
      125          130          135
gcc gtt att gat aga gct tta agc aag cat cgc gat gag gcc atc caa 486
Ala Val ile Asp Arg Ala Leu Ser Lys His Arg Asp Glu Ala ile Gln
      140          145          150
aga cat gca gca ggt gcc aag aga gat ttt gct gaa tca tct gca ttc 534
Arg His Ala Ala Gly Ala Lys Arg Asp Phe Ala Glu Ser Ser Ala Phe
      155          160          165
att cag gtc atg aaa cag cag tcc aat ctt aca gat agc gac cta agt 582
ile Gln Val Met Lys Gln Gln Ser Asn Leu Thr Asp Ser Asp Leu Ser
      170          175          180          185
atc att gca ggc aat gtt cct gtt tat aaa ttt agt aat ttt atc gga 630
ile ile Ala Ala Asn Val Pro Val Tyr Lys Phe Ser Asn Phe ile Gly
      190          195          200
cag ttg gag agc aga att tcc caa ggc gca gca act acc agt ctt agc 678
Gln Leu Glu Ser Arg ile Ser Gln Gly Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser
      205          210          215
gat gca aag aga gcc gtt gac ttc att ctg ctc tat tgt caa ctt gta 726
Asp Ala Lys Arg Ala Val Asp Phe ile Leu Leu Tyr Cys Gln Leu Val
      220          225          230
gtc atg aga gaa acc ttg ctg gtc gac ttg gct att ctc tac agg aaa 774
Val Met Arg Glu Thr Leu Leu Val Asp Leu Ala ile Leu Tyr Arg Lys
      235          240          245
gga aat gca gaa cac gtg gca agt gct gtg gaa aac gct aat agg gta 822
Gly Asn Ala Glu His Val Ala Ser Ala Val Glu Asn Ala Asn Arg Val
      250          255          260          265

```

```

aac aaa gag cta gct gct gat acc cta gat ttt ctt cat aaa ttg att 870
Asn Lys Glu Leu Ala Ala Asp Thr Leu Asp Phe Leu His Lys Leu Ile
      270      275      280
cct gaa caa gca ttg ata ggt gca gtt tat cat cca att tct gcc tct 918
Pro Glu Gln Ala Leu Ile Gly Ala Val Tyr His Pro Ile Ser Ala Ser
      285      290      295
gaa act agc aaa gca ata tta aat tac acg aaa tac ttt gga gtt cca 966
Glu Thr Ser Lys Ala Ile Leu Asn Tyr Thr Lys Tyr Phe Gly Val Pro
      300      305      310
gat gtt ccc cgt cct att gga aac cgc aga tac aaa ttt aca aat agt 1014
Asp Val Pro Arg Pro Ile Gly Asn Arg Arg Tyr Lys Phe Thr Asn Ser
      315      320      325
tac tgg aat acc tac agt ata tgc agt gag gct tac atg gga aat tac 1062
Tyr Trp Asn Thr Tyr Ser Ile Cys Ser Glu Ala Tyr Met Gly Asn Tyr
      330      335      340      345
atg ttc aga ggc tgt tct aac gtt cgg aat cca aat atc agg gta tcc 1110
Met Phe Arg Gly Cys Ser Asn Val Arg Asn Pro Asn Ile Arg Val Ser
      350      355      360
aaa atg tct gat ggg ttt tac acc atg gag aat agc gat cgg agg aag 1158
Lys Met Ser Asp Gly Phe Tyr Thr Met Glu Asn Ser Asp Arg Arg Lys
      365      370      375
ttg tat atc acc aag cat gac caa gga tgg gga tgg ggt act ttg gat 1206
Leu Tyr Ile Thr Lys His Asp Gln Gly Trp Gly Trp Gly Thr Leu Asp
      380      385      390
gag gat cca ggt gac caa ggc cat atg agg ttc att cct ttg aga cat 1254
Glu Asp Pro Gly Asp Gln Gly His Met Arg Phe Ile Pro Leu Arg His
      395      400      405
ggg aag tat atg gta agc tct aag agg tgg ccc aac tgg ttc atg tat 1302
Gly Lys Tyr Met Val Ser Ser Lys Arg Trp Pro Asn Trp Phe Met Tyr
      410      415      420      425
atg gaa tca agt gcc agt ggc tac att cgc agc tgg gaa aat aat cca 1350
Met Glu Ser Ser Ala Ser Gly Tyr Ile Arg Ser Trp Glu Asn Asn Pro
      430      435      440
gga cct caa gga cat tgg agt ata aca taa ttaaagagga atcaacaatg 1400
Gly Pro Gln Gly His Trp Ser Ile Thr
      445      450
tcccaaggc atacgaatat aagacatcaa acgaatgcag tacttaaagt gcacacttgt 1460
atttctacat aggatgtcgt catgaagtc cataaacat ccagcggact aatttcatat 1520
taaacattaa tgtttcctta taatgcattt tcatgaatc tctatgtga catttcaaga 1580
ggatagttt gaagaaaca aaaaaaaaaa 1610

```

<210> 5

<211> 450

<212> PRT

<213> CARYBDEA RASTONII

<400> 5

Met Ile Leu Lys His Leu Pro Trp Leu Phe Ile Val Leu Ala Ile Thr
 1 5 10 15
 Ser Ala Lys His Gly Lys Arg Ser Asp Val Asn Ser Leu Leu Thr Lys
 20 25 30
 Val Glu Thr Ala Leu Lys Glu Ala Ser Gly Ser Asn Glu Ala Ala Leu
 35 40 45
 Glu Ala Leu Glu Gly Leu Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Pro Asp Arg
 50 55 60
 Val Gly Gln Ala Thr Lys Ile Leu Gly Ser Val Gly Ser Ala Leu Gly
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Ser Gly Asp Ala Thr Lys Ile Ile Ser Gly Cys Leu Asp
 85 90 95
 Ile Val Ala Gly Ile Ala Thr Thr Phe Gly Gly Pro Val Gly Met Gly
 100 105 110
 Ile Gly Ala Val Ala Ser Phe Val Ser Ser Ile Leu Ser Leu Phe Thr
 115 120 125
 Gly Ser Ser Ala Lys Asn Ser Val Ala Ala Val Ile Asp Arg Ala Leu
 130 135 140
 Ser Lys His Arg Asp Glu Ala Ile Gln Arg His Ala Ala Gly Ala Lys
 145 150 155 160
 Arg Asp Phe Ala Glu Ser Ser Ala Phe Ile Gln Val Met Lys Gln Gln
 165 170 175
 Ser Asn Leu Thr Asp Ser Asp Leu Ser Ile Ile Ala Ala Asn Val Pro
 180 185 190
 Val Tyr Lys Phe Ser Asn Phe Ile Gly Gln Leu Glu Ser Arg Ile Ser
 195 200 205
 Gln Gly Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Asp Ala Lys Arg Ala Val Asp
 210 215 220
 Phe Ile Leu Leu Tyr Cys Gln Leu Val Val Met Arg Glu Thr Leu Leu
 225 230 235 240
 Val Asp Leu Ala Ile Leu Tyr Arg Lys Gly Asn Ala Glu His Val Ala
 245 250 255
 Ser Ala Val Glu Asn Ala Asn Arg Val Asn Lys Glu Leu Ala Ala Asp

260 265 270
Thr Leu Asp Phe Leu His Lys Leu Ile Pro Glu Gln Ala Leu Ile Gly
275 280 285
Ala Val Tyr His Pro Ile Ser Ala Ser Glu Thr Ser Lys Ala Ile Leu
290 295 300
Asn Tyr Thr Lys Tyr Phe Gly Val Pro Asp Val Pro Arg Pro Ile Gly
305 310 315 320
Asn Arg Arg Tyr Lys Phe Thr Asn Ser Tyr Trp Asn Thr Tyr Ser Ile
325 330 335
Cys Ser Glu Ala Tyr Met Gly Asn Tyr Met Phe Arg Gly Cys Ser Asn
340 345 350
Val Arg Asn Pro Asn Ile Arg Val Ser Lys Met Ser Asp Gly Phe Tyr
355 360 365
Thr Met Glu Asn Ser Asp Arg Arg Lys Leu Tyr Ile Thr Lys His Asp
370 375 380
Gln Gly Trp Gly Trp Gly Thr Leu Asp Glu Asp Pro Gly Asp Gln Gly
385 390 395 400
His Met Arg Phe Ile Pro Leu Arg His Gly Lys Tyr Met Val Ser Ser
405 410 415
Lys Arg Trp Pro Asn Trp Phe Met Tyr Met Glu Ser Ser Ala Ser Gly
420 425 430
Tyr Ile Arg Ser Trp Glu Asn Asn Pro Gly Pro Gln Gly His Trp Ser
435 440 445
Ile Thr
450

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/JP99/01607

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K14/435, 14/745, C12N1/21, 15/12, A61K38/36, A01N63/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K14/00-14/825, C12N15/11-15/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DBDJ, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Toxicon, Volume 33, Number 3, issued March, 1995, Giandomenico Rottini et al., "Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish <i>Carybdea marsupialis</i> ", pages 315-326	1-16
A	Toxicon, Volume 26, Number 11, issued 1988, Lucio Cariello et al., "Isolation and partial characterization of rhizolysin, a high molecular weight protein with hemolytic activity, from the jellyfish <i>Rhizostoma pulmo</i> ", pages 1057-1065	1-16
A	Biochimica et Biophysica Acta, Volume 667, Number 1, issued 1981, Michael M. Tamkun and David A. Hessinger, "Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-of-War, <i>Physalia physalis</i> ", pages 87-98	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 June, 1999 (22. 06. 99)Date of mailing of the international search report
29 June, 1999 (29. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C07K14/435, 14/745, C12N1/21, 15/12, A61K38/36, A01N63/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C07K14/00-14/825, C12N15/11-15/62		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
GenBank/EMBL/DDBJ, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Toxicon, Volume 33, Number 3, issued March, 1995, Giandomenico Rottini et al., "Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish Carybdea marsupialis", pages 315-326	1-16
A	Toxicon, Volume 26, Number 11, issued 1988, Lucio Cariello et al., "Isolation and partial characterization of rhizolysin, a high molecular weight protein with hemolytic activity, from the jellyfish Rhizostoma pulmo", pages 1057-1065	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	22.06.99	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生 印
		4N 8214
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Biochimica et Biophysica Acta, Volume 667, Number 1, issued 1981, Michael M. Tamkun and David A. Hessinger, "Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-of-War, Physalia physalis", pages 87-98	1-16